AUS DEM PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT
DER FREIEN UNIVERSITAET BERLIN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. HANS HERKEN

WIRKUNG VON 3-AP UND 6-AN AUF DEN HMP-WEG UND AUF DIE MALATENZYM-REAKTION

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWUERDE
AN DEN MEDIZINISCHEN FACHBEREICHEN
DER FREIEN UNIVERSITAET BERLIN

VORGELEGT VON
BARBARA ENGELBERT
AUS JENA

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547025_0053

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr.med. Hans Herken

Wirkung von 3-Acetylpyridin (3-AP) und 6-Aminonicotinsäureamid (6-AN) auf den Hexose-Mono-Phosphat-Weg (HMP-Weg) und auf die Malat-Enzym-Reaktion

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Barbara Engelbert

aus Jena

Referent: Professor Dr.med.Hans Herken

Korreferent:Professor Dr.med.Eberhard Liss

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4.5.72

Inhaltsverzeichnis

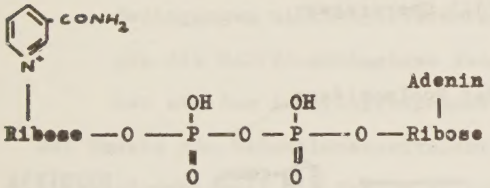
	Seite
Einleitung	4
Übersicht über die durchgeführten Versuche	19
Methodik	22
Ergebnisse	
1.Versuche mit Glucose-1-^{14}C und - 6-^{14}C	
a.an Gehirnschnitten	27
b.mit Zellplasmaextrakt	35
2.Versuche mit L-Malat-U-^{14}C	43
Diskussion	50
Zusammenfassung	56
Danksagung	58
verwendete Substanzen	59
Literaturhinweise	60
Lebenslauf	64

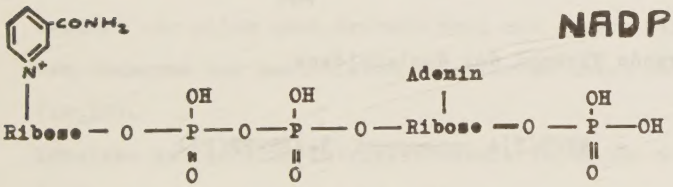
Einleitung

Die Substrate des Energiestoffwechsels werden im tierischen Organismus zu den Endprodukten Kohlendioxyd (CO_2) und Wasser (H_2O) oxydiert.

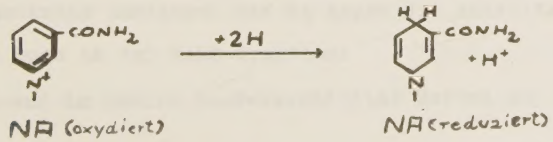
Die Oxydation in der Zelle stellt meist eine Dehydrierung dar. Dabei wird der Wasserstoff des Substrats von der Wirkgruppe der Dehydrogenasen aufgenommen.

Die Wirkgruppen (= Cofermente) der Dehydrogenasen sind die Pyridinnucleotide Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) bzw. Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP).





Der wasserstoffübertragende Teil ist das Nicotinsäureamid (NA). Bei der Hydrierung wird der Pyridinring zweistufig reduziert.



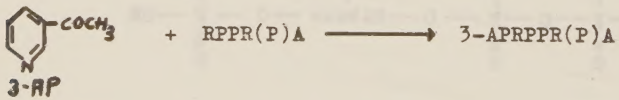
Das reduzierte Coenzym wird durch andere enzymatische Oxydationsprozesse wieder zur oxydierten Form regeneriert.

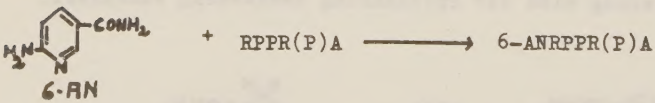
Bei Inkubation von NAD(P) mit 3-Acetylpyridin (3-AP) bzw. 6-Aminonicotinsäureamid (6-AN) in Gegenwart von Hirnmikrosomennucleosidase (Glycohydrolase E.C.3.2.2.6) gelang der Austausch des Nicotinsäureamids (NA) gegen 3-AP bzw. 6-AN (2,3,25,28,30,32,33). Der Mangel an Spezifität der Nucleosidase erlaubt die Synthese der NAD(P) - Analogen:

Durch die hydrolysierende Wirkung der Nucleosidase wird NAD(P) in Nicotinsäureamid (NA) und Ribose-Phosphat-Phosphat-Ribose-(Phosphat)-Adenosin (RPPR(P)A) gespalten und durch die Transferaseaktivität der Nucleosidase das Antivitamin 3-AP bzw.6-AN auf den Ribosylrest (RPPR(P)A) übertragen:

1.Hydrolysierende Wirkung der Nucleosidase

2.Transferierende Wirkung der Nucleosidase





Diese normalerweise nicht vorkommenden Coenzymanalogen können in den meisten Fällen die Funktion des Wasserstofftransports nicht voll erfüllen. Zahlreiche Versuche bestätigten, daß die Aktivität NAD(P)-abhängiger Enzyme in Gegenwart eines Analogen vermindert ist :

1. Der Wasserstofftransport bei einer Reihe von enzymatischen Reaktionen läuft mit dem hydrierbaren 3-APAD(P) als Cofaktor viel langsamer als mit dem natürlichen Pyridinnucleotid ab (5,10,27).
   Nur in vereinzelten enzymatischen Reaktionen sind Umsatzbeschleunigungen beschrieben worden (11,27).
2. Andere Coenzymanalogen, wie das unter physiologischen Bedingungen nicht hydrierbare 6-ANAD(P), beeinträchtigen die NAD(P)-abhängigen Reaktionen wesentlich stärker als das Acetylpyridinanaloge (4,10,11,30).

Der Umsatz von Reduktionsäquivalenten ist nicht nur deshalb eingeschränkt, weil die Konzentration an funktionstüchtigen Pyridinnucleotiden durch Bildung der Analogen vermindert ist, sondern vor allem auch deshalb, weil die abnorm strukturierten Coenzyme den natürlichen Cofaktor am Enzym verdrängen (10,22).

Erhalten Ratten eine intraperitoneale Injektion von 3-AP bzw. 6-AN, so treten zentralnervöse Störungen auf.

Es konnte nachgewiesen werden, daß diese Substanzen in die Nucleotide des Gehirns eingebaut werden (1,2,6,31).

Der enzymatische Austausch des NA gegen die Antivitamine ist besonders hoch in der NADP-Fraktion:

1. Während im Gehirn 3-AP-vergifteter Ratten nur 5-10 %

des natürlichen Nucleotids NAD in 3-APAD umgewandelt werden, beträgt die Bildung von 3-APADP 27-31%, im Hippocampus sogar 47% des Coenzyms NADP (1,2,3,6,22).

2. 18 Std. nach Applikation von 50mg 6-AN/kg Ratte wurden 75% des NADP als unphysiologisches 6-ANADP gefunden, während die 6-ANAD-Menge 1/10 des NAD-Gehaltes betrug (31).

Wenn man bedenkt, daß der NADP-Gehalt im Gehirn im Vergleich zur NAD-Konzentration sehr gering ist (35,39), folgt, daß durch die Umwandlung einer verhältnismäßig hohen Prozentsatzes des NADP in das Analoge in besonderem Maße NADP-bedürftige Enzymreaktionen beeinträchtigt werden.

Stoffwechselschritte, die NADP benötigen, dienen vorwiegend der Bereitstellung von NADPH als reduzierendem Agens, das in zahlreichen Synthesereaktionen eine unentbehrliche Rolle spielt, wie Fettsäure-, Nucleinsäure-, Peptidsynthese.

Die größte Aktivität der Nucleosidase, die die Biosynthese der genannten Nucleotide ermöglicht, findet sich im extramitochondrialen Raum der Zelle(1).

Wenn die Bildung der NADP-Analogen eine Verringerung der Geschwindigkeit des Wasserstofftransportes bedingt, so sollten im extramitochondrialen Raum der Zelle der Hexose-Mono-Phosphat-Weg (HMP-Weg) mit zwei wichtigen Oxydationsschritten (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion, 6-Phospho-Gluconsäure-Dehydrogenase-Reaktion) und die NADP-abhängige Malat-Enzym-Reaktion (Ochoa) betroffen werden.

Bei in-vitro-Versuchen mit den unphysiologischen Dinucleotiden 3-APADP und 6-ANADP haben Coper und Neubert (10,11) folgende Ergebnisse erhalten:

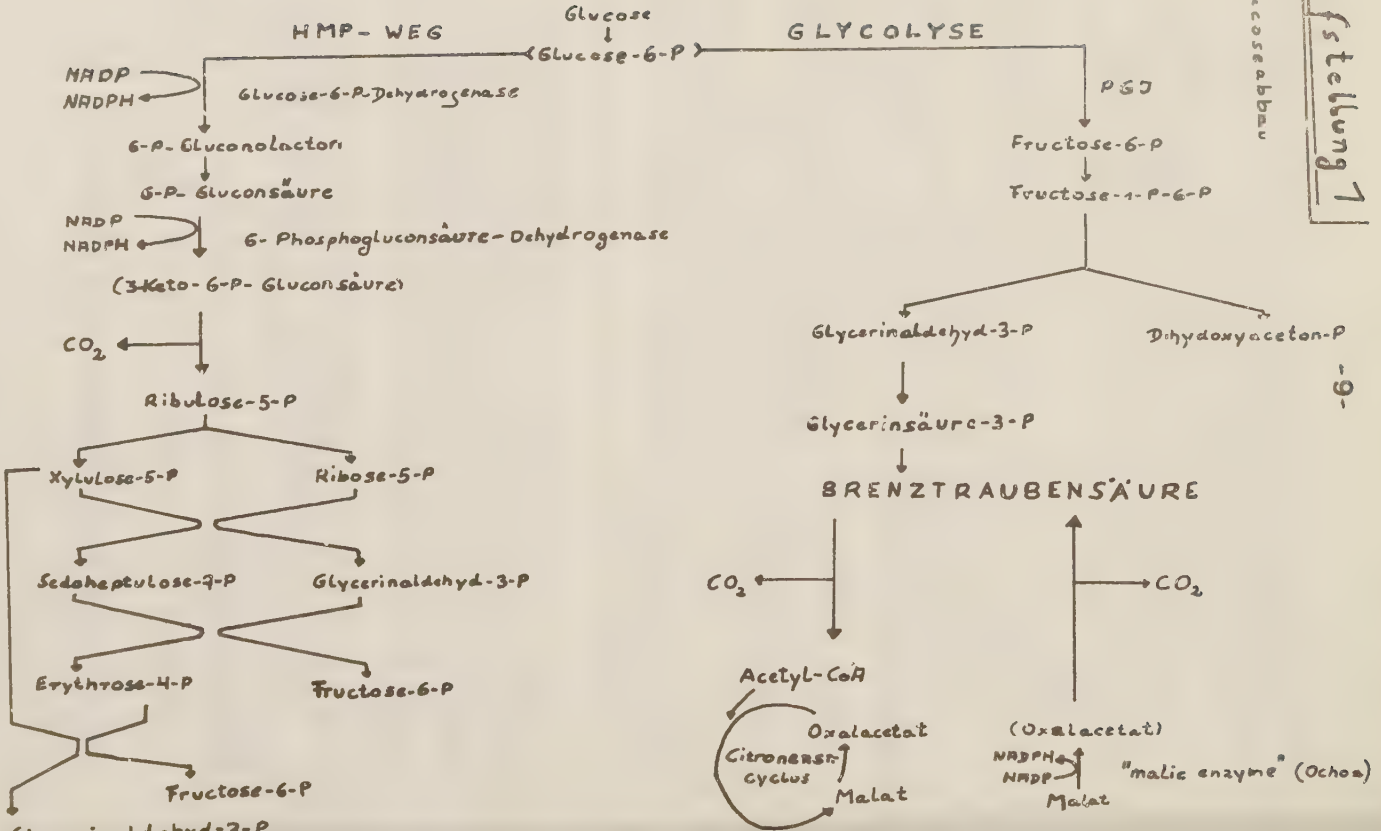
1. Die Aktivität der NADP-abhängigen Oxydoreduktase Gluco-

se-6-Phosphat-Dehydrogenase des Rattenhirn war vermindert, wenn 3-APADP als Coenzym verwendet wurde.

2. In Gegenwart von 3-APADP als Cofaktor katalysiert das Malatenzym die Umsetzung vom Malat zum Pyruvat entgegen den Erwartungen schneller als mit dem natürlichen Pyridinnucleotid.
3. Das nicht reduzierbare Analoge 6-ANADP wirkt als kompetitiver Hemmstoff dieser beiden Reaktionen.

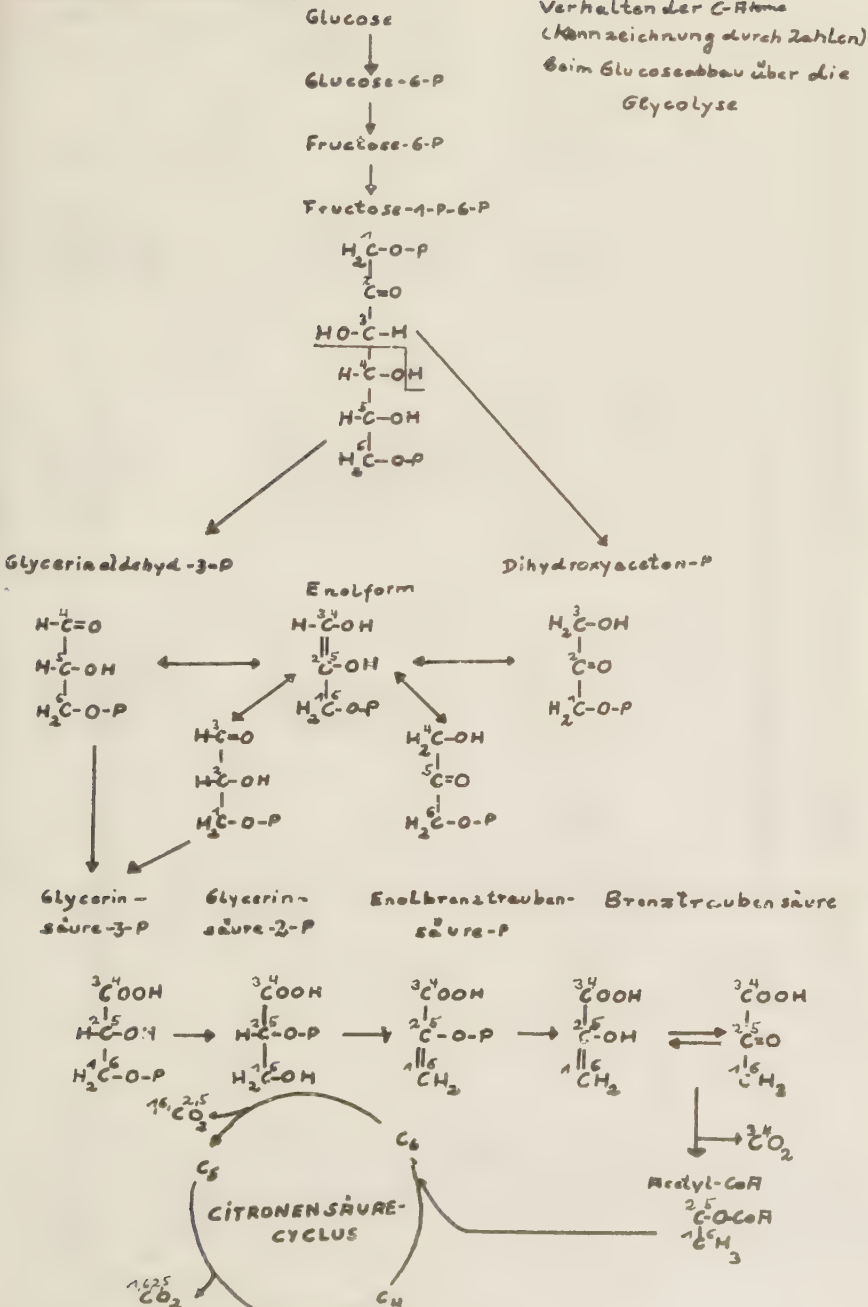
Die an den NADP-abhängigen Fermenten des HMP-Weges und der Malatenzym-Reaktion erhobenen Befunde werden in dieser Arbeit durch Experimente ergänzt, in denen die CO_2-Produktion aus der Oxydation von ^{14}C-D-Glucose über den HMP-Weg und aus der decarboxylierenden Umsetzung von L-Malat-U-^{14}C zum Pyruvat gemessen wird.
Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zu ermitteln, welchen Einfluß die unphysiologischen Dinucleotide 3-APADP und 6-ANADP auf die beiden Stoffwechselwege haben.

Das folgende Stoffwechselschema soll zunächst einen Überblick über die einzelnen Reaktionsschritte des HMP-Weges und der Malatenzymreaktion sowie deren Beziehung zum Glucoseabbau über die Glycolyse und den Tricarbonsäurecyclus (Citronensäurecyclus) vermitteln.
Die weiteren drei Aufstellungen zeigen das Verhalten der einzelnen C-Atome beim Glucoseabbau über die Glycolyse und den HMP-Weg. Nähere Erläuterungen s.u.


HMP-WEG
Glucose
GLYCOLYSE
Glucose-6-P
NADP
NADPH
Glucose-6-P-Dehydrogenase
PGI
6-P-Gluconolacton
Fructose-6-P
6-P-Gluconsäure
Fructose-1-P-6-P
NADP
NADPH
6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase
(3-Keto-6-P-Gluconsäure)
Glycerinaldehyd-3-P
Dihydroxyaceton-P
CO_2
Ribulose-5-P
Glycerinsäure-3-P
Xylulose-5-P
Ribose-5-P
BRENZTRAUBENSÄURE
Sedoheptulose-7-P
Glycerinaldehyd-3-P
CO_2
CO_2
Erythrose-4-P
Fructose-6-P
Acetyl-CoA
Fructose-6-P
Oxalacetat
(Oxalacetat)
Citronensäure-Cyclus
NADPH
NADP
"malic enzyme" (Ochoa)
Malat
Malat

Aufstellung 2

Verhalten der C-Atome (Kennzeichnung durch Zahlen) beim Glucoseabbau über die Glycolyse



Aufstellung 3

Verhalten der C-Atome [Kennzeichnung durch Zahlen] beim Glucoseabbau über den HMP-Weg

Phosphat durch Pfeilspitze

Phospho-Glucose-Isomerase (PGI)

Glucose 6 P

6-P-Gluconolacton

6-P-Gluconsäure

CO_2

3 Keto-6Phospho-gluconsäure

Ribulose-5-P

Ribose -5-P

Sedoheptulose -7-P

Fructose -6-P

Fructose -6-P

Xylulose -5-P

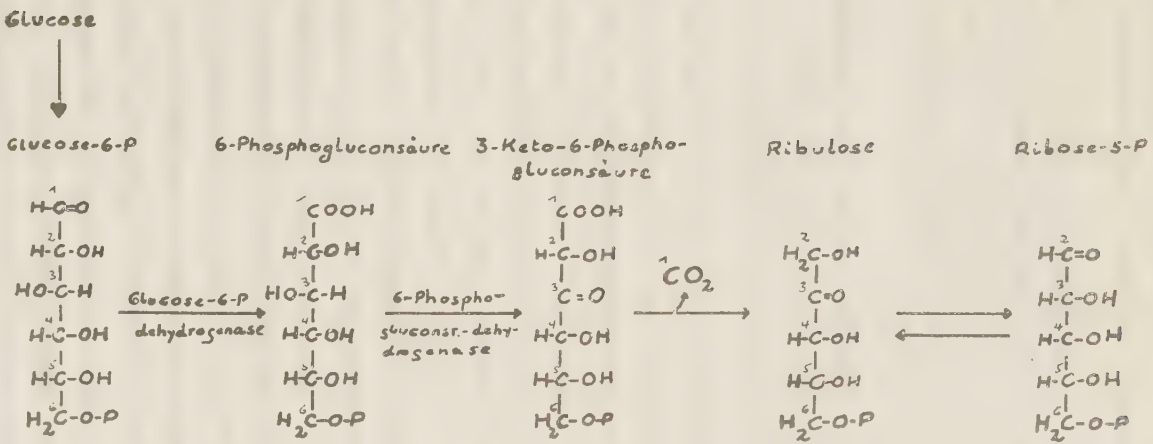
Glycerinaldehyd -3-P

Erythrose -4-P

Glycerinaldehyd -3-P

Verhalten der C-Atome beim Glucoseabbau über den HMP-Weg

Phosphat ist durch P abgekürzt



A. C_1-Oxydation der Glucose = Hexose-Mono-Phosphat-Weg = HMP-Weg

- Versuche mit Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C

Die von der Zelle aufgenommene Glucose wird zunächst immer in 6-Stellung phosphoryliert. Das entstandene Glucose-6-Phosphat ist, ganz allgemein, die stoffwechselaktive Form der Glucose.
Der oxydative Abbau der Glucose kann theoretisch über zwei Stoffwechselwege erfolgen:

1. über die Glycolyse und den Tricarbonsäurecyclus (Citronensäurecyclus), s. Aufstellung 1 und 2
2. über den Hexose-Monophosphat-Weg, s. Aufstellung 1, 3 und 4

1. Unter Glycolyse versteht man eigentlich den anaeroben Abbau der Kohlenhydrate über Brenztraubensäure (Pyruvat) zur Milchsäure. Es hat sich jedoch gezeigt, daß in der tierischen Zelle auch unter aeroben Bedingungen der Glucoseabbau bis zur Stufe der Brenztraubensäure über den Glycolyseweg verläuft:
Das Ferment Phosphoglucoseisomerase (PGI) katalysiert die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat, das in Fructose-1,6-Diphosphat überführt wird. Der Hexose-Diphosphatester zerfällt in zwei Moleküle Triosephosphat (Glycerinaldehyd-3-P und Dihydroxyaceton-P), die über eine gemeinsame Enolform im Gleichgewicht stehen. Die Aldehydgruppe des Glycerinaldehyd-3-Phosphates wird zur Carbonsäure dehydriert und das entstandene Glycerinsäure-3-Phosphat in Glycerinsäure-2-Phosphat umgelagert. Durch Wasserabspaltung entsteht aus dem letzteren die phosphorylierte Enolform der Brenztraubensäure. Der Phosphatrest wird auf ADP übertragen, und es entsteht als wichtigster Metabolit im aeroben und anaeroben Kohlenhydrat-

stoffwechsels die Brenztraubensäure.

Unter aeroben Bedingungen wird die Brenztraubensäure über ein kompliziertes Enzymsystem decarboxyliert und gleichzeitig oxydiert,wobei Essigsäure entsteht,die an das Coenzym A gebunden ist und in dieser Form als "aktivierte Essigsäure" bezeichnet wird.Die "aktivierte Essigsäure" (Acetyl-CoA) wird in den Tricarbonsäurecyclus (Citronensäurecyclus) eingeschleust.Hier wird die Endoxydation der intermediär entstehenden 2-Kohlenstoff-Fragmente durchgeführt.

Wie aus der Aufstellung 2 ersichtlich ist,findet zunächst die Elimirierung des 3. und 4. Kohlenstoffatoms der Glucose beim Übergang vom Pyruvat (Brenztraubensäure) zur "aktivierten Essigsäure" statt,während die C-Atome 1,2,5 und 6 in den Citronensäurecyclus eingehen.

Da Dihydroxyacetonphosphat über die Triosephosphatisomerase (TIM) in Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgewandelt wird,ist der Abbau der C-Atome 1 und 6 identisch,beide werden in Methylgruppen des Pyruvats umgewandelt.

2.Die aus Glucose-6-Phosphat durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Gegenwart von NADP gebildete 6-Phosphogluconsäure kann durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase unter Reduktion von NADP und CO_2-Entwicklung weiter oxydiert werden.Das Produkt der oxydativen Decarboxylierung des 1. C-Atoms der Glucose ist Ribulose-5-Phosphat.Unter Einwirkung zweier verschiedener Fermente wird Ribulose-5-P mit Ribose-5-P und Xylulose-5-P ins Gleichgewicht gesetzt.Spaltung der entstandenen Pentosen und Recombination der Fragmente führen zu neuen Kohlenstoffketten. Durch diese Reaktionsfolge wird Pentosephosphat immer wieder

zu Hexose-P regeneriert.

Beim Abbau der Glucose über den Pentosephosphatcyclus geht primär das 1. C-Atom als CO_2 verloren,dagegen durchläuft das 6 .C-Atom der Glucose die einzelnen Reaktionsschritte des HMP-Weges und wird zum Aufbau der Hexose wieder verwendet.

Während also beim Glucoseabbau über den Glycolyse-Weg und den Tricarbonsäurecyclus das 1. und 6. C-Atom der Glucose in gleichem Umfange zu CO_2 oxydiert werden,spricht ein Überwiegen der $C_{(1)}O_2$-Produktion für einen Glucosestoffwechsel sowohl über die Glycolyse und den Tricarbonsäurecyclus als auch über den HMP-Weg (12,13,15,16,17,18,35).

Um den Anteil des HMP-Weges an der Glucoseoxydation zu bestimmen,wurde die CO_2-Eliminierung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C verglichen.Als Index für die Beteiligung des HMP-Weges diente der Quotient $^{14}C_{(6)}O_2/\ ^{14}C_{(1)}O_2$.

Die Stoffwechseluntersuchungen erfolgten an Hirnschnitten und mit Zellplasma von Ratten.

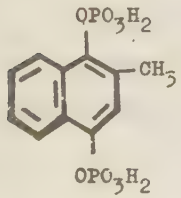
Mit den Versuchen an Hirnschnitten sollte zunächst ermittelt werden,in welchem Verhältnis die beiden oxydativen Glucoseabbauwege ablaufen.

Bei Versuchen mit Zellplasma ist eine $^{14}CO_2$-Eliminierung nur über den HMP-Weg zu erwarten,denn die Enzyme des Citronensäurecyclus,die die Endoxydation des 1. und 6. C-Atoms der Glucose zu CO_2 bewirken,sind in dieser Fraktion nicht vorhanden.Das Zellplasma enthält nur die Enzyme des HMP-Weges,unter deren Einfluß das 1. C-Atom der Glucose als CO_2 freigesetzt wird,und die Enzyme der Glycolyse,die die Glucose unter aeroben Bedingungen bis zur Brenztraubensäure bzw.unter anaeroben Bedingun-

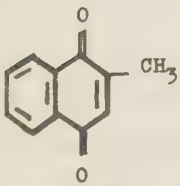
gen bis zur Milchsäure abbauen (21).

Da die Geschwindigkeit des HMP-Weges durch das Angebot von NADP limitiert wird und die Reoxydation von NADPH eine entscheidende Rolle spielt(7,12,18,19,20,21,24,34),wurde versucht,die Glucose-6-Phosphat-Oxydation durch Zusatz von Elektronenacceptoren wie

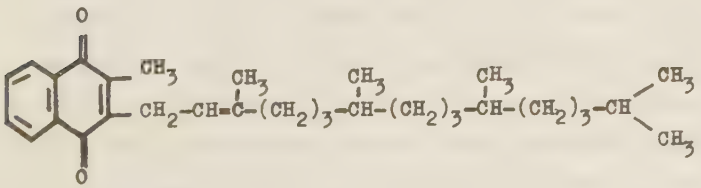
2-Methyl-1,4-Naphthohydrochinon-Diphosphat = Synkavit



2-Methyl-1,4-Naphthochinon = Vit.K_3 = Menadion



2-Methyl-3-Phythyl-1,4-Naphthochinon = Vit.K1 = Phyllochinon

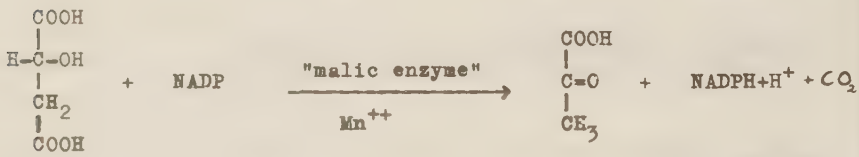


zu beeinflussen.Sodann wurde untersucht,welchen Einfluß NADPH-Zusatz zum Inkubationsmedium auf die direkte Glucoseoxydation hat.

B. Die decarboxylierende Malatumsetzung zum Pyruvat durch das "malic-enzyme" (Ochoa)

- Versuche mit L-Malat-U-^{14}C

Weiterhin wurde die CO_2-Entstehung bei der Umsetzung vom Malat (Äpfelsäure) zum Pyruvat (Brenztraubensäure) im Zellplasma gemessen. Der Mechanismus dieser Reaktion wurde von Ochoa (8) aufgedeckt. Das aus Taubenleber isolierte Ferment L-Malat-NADP-Oxydoreduktase (decarboxylierend) (E.C.1.1.1.40) findet sich im extramitochondrialen Raum der Zelle. Es bewirkt in Gegenwart von NADP die Spaltung von Äpfelsäure in CO_2 und Brenztraubensäure, wobei das Coferment hydriert wird:



Malat Pyruvat

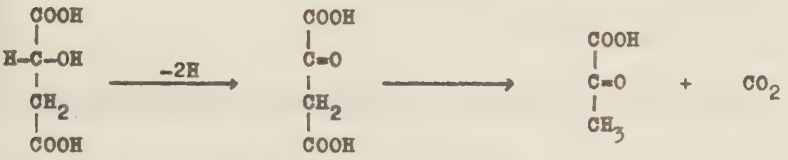
Die Reduktion von NADP erfolgt in Anwesenheit von Mangansalzen. Das Ferment ist streng spezifisch für NADP und L-Malat und zeigt ein scharfes pH-Optimum bei pH 7,4.

Da auch diese Reaktion von der Geschwindigkeit der NADPH-Reoxydation geregelt wird (9), d.h. vom Verhältnis NADP / NADPH, wurde der Einfluß von NADP, NADPH und Menadion auf den Malatumsatz zu CO_2 untersucht.

NADP kann sowohl für das "malic enzyme" als auch für die Malatdehydrogenase als Coferment wirken. Beide Fermente sind im Zellplasma vorhanden.

Die NAD-abhängige Malatdehydrogenase katalysiert die Umwandlung

vom Malat zum Oxalacetat,das als ß- Ketosäure instabil ist und zum Teil spontan in CO_2 und Brenztraubensäure zerfallen kann:



Malat Oxalacetat Pyruvat

Um zu erforschen,welcher der beiden Reaktionswege durch NADP beschleunigt wird,wurde anstelle von NADP NAD ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium gegeben und die CO_2-Eliminierung aus Malat unter NAD-Einfluß gemessen.

Übersicht über die durchgeführten Versuche

Die an Rattengehirnen durchgeführten Versuche lassen sich als Übersicht wie folgt gliedern:

A. C_1-Oxydation der Glucose - Hexose-Mono-Phosphat (HMP)-Weg

I. Versuche an Gehirnschnitten

1. Wirkung der 3-AP-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C 6 Std.nach Verabreichung von
   a. 70 mg 3-AP/kg Ratte
      ohne und
      mit Synkavitzusatz zum Inkubationsmedium (10mg%)
   b. 120 mg 3-AP/kg Ratte
      mit Synkavitzusatz zum Inkubationsmedium (10mg%)

2. Wirkung der 6-AN-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C 6 Std.nach Verabreichung von
   70 mg 6-AN/kg Ratte
      ohne und
      mit Synkavitzusatz zum Inkubationsmedium (10mg%)

II. Versuche mit Zellplasmaextrakt

a. Versuche mit Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C

1. Wirkung der 3-AP-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C 6 Std.nach Verabreichung von
   70 mg 3-AP/kg Ratte

2. Wirkung der 6-AN-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C 6 Std.nach Verabreichung von
   70 mg 6-AN/kg Ratte

3. Wirkung von NADP-Zugabe ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C

b. Versuche mit Glucose-1-^{14}C

1. Wirkung von

a. Vit.K_1 ($1,96x10^{-4}$m , $2,06x10^{-3}$m) -

b. Vit.K_3 (Menadion) ($5x10^{-7}$m, $5x10^{-6}$m, $5x10^{-4}$m) -

c. NADPH ($5x10^{-5}$m) -

d. NADPH ($5x10^{-5}$m) und Synkavit ($1,5x10^{-4}$m) -

Zusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C.

2. Wirkung von 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C

a. 6 Std. nach Verabreichung von 70 mg 3-AP/kg Ratte

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

b. ohne Vorbehandlung der Ratten

mit Zusatz von 3-APADP ($5x10^{-5}$m) und NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium.

3. Wirkung von 6-AN auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C

a. 6 Std. nach Verabreichung von 70 mg 6-AN/kg Ratte

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

b. ohne Vorbehandlung der Ratten

mit Zusatz von 6-ANADP ($5x10^{-5}$m) und NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium.

B. Die decarboxylierende Malatumsetzung zum Pyruvat durch das "malic-enzyme" (Ocnoa).

-Versuche mit Zellplasmaextrakt

1.Wirkung von

a. NADP ($5x10^{-5}$m) -

b. NADPH ($5x10^{-5}$m) -

c. NADPH ($5x10^{-5}$m) und Menadion (ca.10^{-4}m) -

d. Menadion ($5x10^{-4}$m) -

Zusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C.

2.Wirkung von 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C

a. 6 Std.nach Verabreichung von 70mg 3-AP/kg Ratte

ohne und

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

b. ohne Vorbehandlung der Ratten

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) und 3-APADP ($5x10^{-5}$m)

zum Inkubationsmedium.

3. Wirkung von 6-AN auf die $14CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C

a. 6Std.nach Verabreichung von 70mg 6-AN/kg Ratte

ohne und

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m)sum Inkubationsmedium

b.ohne Vorbehandlung der Ratten

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) und 6-ANADP ($5x10^{-5}$m)

zum Inkubationsmedium

4. Wirkung von NAD ($5x10^{-5}$m)-Zusatz sum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C

Methodik

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche weiße Ratten mit einem Gewicht von 200-300g .

Bei Experimenten,in denen der Einfluß der 3-AP- bzw.6-AN- Vergiftung auf den Glucose- bzw. Malatstoffwechsel untersucht wurde,erhielten die Ratten eine intraperitoneale Injektion von 70 mg (120 mg) 3-AP/kg Ratte bzw. 70 mg 6-AN/kg Ratte.Die Tiere wurden 6 Stunden nach Applikation der Substanzen decapitiert, denn zu diesem Zeitpunkt ist nahezu der maximale Einbau der Antivitamine in die Nucleotide des Gehirns erreicht (1).

Als Kontrolltiere wurden unbehandelte Ratten gleichen Gewichtes und Geschlechtes verwendet.

Versuche mit den unphysiologischen Dinucleotiden 3-APADP bzw. 6-ANADP erfolgten an Präparaten von unbehandelten Tieren.

Versuche an Gehirnschnitten - mit Glucose-1-^{14}C und -6-^{14}C

Das Gehirn kam unmittelbar nach vorsichtigem Herauslösen aus der Schädelkapsel in einen eisgekühlten glucosefreien Phosphatpuffer pH 7,4 (x_1) .

Die Gehirnschnitte wurden auf einem Korkbrettchen,das mit einem angefeuchteten Filterpapier bedeckt war,mit einem kalten,ebenfalls feuchten Rasiermesser angefertigt und in je ein Warburggefäß gegeben,das im Hauptraum als Substrat 2ml Phosphatpuffer pH 7,4 (x_1) mit 1,10 mg/ml Glucose enthielt.

Vor und während des Einbringens der Gehirnschnitte in die Wargefäße wurde der in ihnen enthaltene Stoffwechselpuffer mit reinem O_2 begast.

Pro Versuch lief ein Gefäß,dessen Inhalt ebenfalls mit Sauerstoff gesättigt worden war,ohne Gewebsschnitt als Thermobarometer mit. Mit Hilfe einer Aufhängevorrichtung konnten alle Gefäße zum gleichen Zeitpunkt in den Warburgapparat eingelassen werden.

Zum Temperaturausgleich bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 100/Min.wurde eine Vorinkubationszeit von 15 Min.gewählt,da Gehirngewebe erst nach 10-minütiger Vorinkubation in glucosehaltiger Lösung eine konstante Glucoseumsatzrate zu CO_2 zeigt (12).

Der eigentliche Versuchsbeginn erfolgte durch Zugabe von 0,1 ml Glucose-1-^{14}C bzw. Glucose-6-^{14}C aus dem Seitenarm des Warburggefäßes (= Zeitpunkt 0 der Inkubation) durch Kippen des Gefäßes.

Die Zeit vom Decapitieren bis Versuchsanfang betrug im Durchschnitt 25 Min.

Das entwickelte CO_2 wurde von 0,2 ml 10%-iger KOH im Einsatz des Gefäßes gebunden.Die Ablesung am Manometer fand in Abständen von 5 Min. statt.

Nach 40 Min. Inkubation wurde Säure (0,2 ml 20%-ige H_2SO_4) in den Seitenarm des Warburggefäßes einpippetiert und durch Kippen des Gefäßes die Reaktion beendet.

Anschließend blieben die Gefäße noch ca. 1 Stunde im Warburgapparat,damit alles entwickelte CO_2 gebunden wird.

Die Gehirnschnitte wurden mit destilliertem Wasser abgespült und in den Trockenschrank (90°C) gestellt,bis das Trockengewicht einen konstanten Wert erreichte.

Der O_2-Verbrauch wurde nach der üblichen Art berechnet.

Um das bei der Reaktion entstandene $^{14}CO_2$ zu messen,wurde der gesamte Inhalt des Gefäßeinsatzes unter Ausspülen in ein Kie-

selgel-Dioxangemisch (x_4) überführt und die Aktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Unter Berücksichtigung der prozentualen Zählausbeute wurden die Zerfälle/Min. (dpm) berechnet.

Der Zusatz von Synkavit in einer Konzentration von 0,1 mg/l ml erfolgte direkt in den Hauptraum des Warburggefäßes vor Versuchsbeginn.

Das Warburggefäß enthielt:

im Hauptraum : 2,0 ml Phosphatpuffer pH 7,4 mit 110 mg% Glucose

im Seitenarm : 0,1 ml Glucose-1-^{14}C bzw. -6-^{14}C (1,0 µc/ 0,1 ml)

Versuche mit Zellplasma - mit Glucose-1-^{14}C bzw. -6-^{14}C

- mit L-Malat-U-^{14}C

Die Aufbereitung der Gehirne erfolgte im Kühlraum bei 4°C:

Drei Gehirne, deren Gesamtgewicht ca. 5g betrug, wurden in eiskalter, isotoner Saccharoselösung (0,25m x_2) bzw. Phosphatpuffer pH 7,4 (x_1) gespült, in 20 ml des gleichen Mediums homogenisiert und 90 min. bei 49000 U/Min. (g=150 000) zentrifugiert.

X ml des Überstandes, s.u., wurden in den Hauptraum des Warburggefäßes einpipettiert.

In den Seitenarm wurde die radioaktive Substanz, in den Einsatz - zum Auffangen des produzierten CO_2 - 10%-ige KOH (0,2 ml) gegeben.

Pro Versuchsansatz wurden zwei Gefäße als Leerwerte benutzt, um eventuell spontan auftretende Decarboxylierungen des Substrats bei der Auswertung der Versuche berücksichtigen zu können.

Die als Thermobarometer und gleichzeitig als Leerwerte für die CO_2-Entwicklung verwendeten Warburggefäße enthielten anstelle des Plasmas entsprechend dem Aufbereitungsmedium im Hauptraum 2 ml Trispuffer pH 7,4 (x_3),wenn das Plasma mit Saccharose hergestellt worden war,andernfalls 2 ml Phosphatpuffer pH 7,4 (x_1).
Bei jedem Ansatz wurden 15 Warburggefäße ohne Manometer verwendet.
Nach 5 Min. Temperaturausgleich wurde durch Zugabe der markierten Substanz (s.u.) aus dem Seitenarm der Zeitpunkt 0 der Inkubation festgelegt.
Die Reaktion wurde,wie oben beschrieben,mit 0,2 ml 20%-iger H_2SO_4 gestoppt.
Zum Gasausgleich blieben die Gefäße noch ca. 30 Min. im Warburgapparat.
Der Inhalt des Gefäßeinsatzes kam in ein Kieselgel-Dioxangemisch (x_4).Das radioaktive $^{14}CO_2$ wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt (s.o.).
Die Zusätze zum Inkubationsmedium wurden in den angegebenen Konzentrationen (s. Versuch) z.T. direkt in den Hauptraum des Warburggefäßes vor Versuchsbeginn,z.T. aus dem Seitenarm zusammen mit der markierten Substanz zum Zeitpunkt 0 der Inkubation zugegeben.
Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration im Inkubationsmedium.

A. Versuche mit Glucose-1-^{14}C bzw. -6-^{14}C (1,0 µC) mit Zellplasma

a. Bei Versuchen mit Phosphatpufferhomogenisat pH 7,4 enthielt das Warburggefäß:

im Hauptraum	:	2,0 ml Zellplasmaextrakt
(Leerwert	:	2,0 ml Phosphatpuffer pH 7,4)
im Seitenarm	:	0,1 ml Glucose-1-^{14}C bzw. -6-^{14}C

b. Bei Versuchen mit in 0,25 m Saccharose homogenisierten Gehirnen enthielt das Warburggefäß:

im Hauptraum	:	1,0 ml Zellplasmaextrakt und
		1,0 ml Trispuffer pH 7,4 (x_3)
(Leerwert	:	2,0 ml Trispuffer pH 7,4 (x_3))
im Seitenarm	:	0,1 ml Glucose-1-^{14}C bzw. -6-^{14}C
		bei Versuch IIa_3, $II_{bl_8+\delta}$, $IIb_{3\alpha\,(x_4)}$
		zusätzlich
		0,1 ml 1%-ige unmarkierte Glucose
		bei Versuch $IIb_{3\beta}$
		zusätzlich
		0,1 ml 5,4%-ige unmarkierte Glucose

B. Versuche mit L-Malat-U-^{14}C (0,4 µC) mit Zellplasma

Als Aufbereitungsmedium diente 0,25m Saccharose.

Das Warburggefäß enthielt:

im Hauptraum	:	1,0 ml Zellplasmaextrakt und
		1,0 ml Trispuffer pH 7,4 (x_3)
(Leerwert	:	2,0 ml Trispuffer pH 7,4 (x_3))
im Seitenarm	:	0,1 ml L-Malat-U-^{14}C und
		0,1 ml DL-Malat 2×10^{-2}m

Versuchsdauer : Aa 40 Min., Ab 60 Min., B 60 Min.

Ergebnisse

A. C_1-Oxydation der Glucose-Hexose-Mono-Phosphat-Weg

I. Versuche an Gehirnschnitten mit Glucose-1-^{14}C und -6-^{14}C

Wird Hirngewebe mit Glucose als Substrat inkubiert, findet man einen Respirationsquotienten ($RQ=CO_2/O_2$) von 1, d.h., bei Glucoseangebot im Nährmedium von Hirnschnitten werden nur Kohlenhydrate verbrannt (12,13).

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

Aus diesem Grunde konnte das aus der markierten Glucose entstandene radioaktive $^{14}CO_2$ (dpm) auf den verbrauchten Sauerstoff (µl) bezogen werden.

Der QO_2 (O_2-Verbrauch/mg Trockengewicht und Stunde) betrug im Durchschnitt 12,9 µl (vgl.13,36) und wurde auf 14,3 µl erhöht, wenn Synkavit (1mg/1ml) im Inkubationsmedium vorhanden war (14, 15) (Tab.1).

Tab.1 QO_2 (O_2-Verbrauch (µl)/mg Trockengewicht und Stunde) bei Inkubation von Hirnschnitten mit Glucose

Zusatz zum Inkubationsmedium	QO_2 (µl O_2/mg T.u.Std.)			2σ
		n	$s\bar{x}$	
———	12,9	33	± 0,233	<0,001
Synkavit (1mg/1ml)	14,3	26	± 0,319	

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

Die Stimulierung der Atmung durch Synkavit wird von Hoskin (15) auf eine Vergrößerung der direkten Glucoseoxydation (HMP-Weg) zurückgeführt.

1.Wirkung der 3-AP-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung 6 Stunden nach Verabreichung von

a. 70mg 3-AP/kg Ratte

ohne und

mit Synkavitzusatz (10mg%) zum Inkubationsmedium

Bei der Inkubation von Gehirnschnitten unbehandelter Kontrolltiere mit Glucose-1-^{14}C oder Glucose-6-^{14}C zeigt sich,entsprechend den Ergebnissen von Hoskin (15,16),daß aus beiden nahezu gleiche Anteile von $^{14}CO_2$ produziert werden.

Da zur vollständigen Verbrennung eines Glucosemoleküls immer gleiche Mengen von Sauerstoff verbraucht werden,der RQ also 1 beträgt (vgl.die oben angeführte Formel),konnte der auf Sauerstoff (µl) bezogene radioaktive Kohlenstoff (dpm) aus Glucose-1-^{14}C mit demjenigen aus Glucose-6-^{14}C verglichen werden.

Der gefundene Quotient $^{14}C_{(6)}O_2$ / $^{14}C_{(1)}O_2$ =1,13 spricht für einen überwiegenden Glucoseabbau über die Glycolyse und den Tricarbonsäurecyclus (12,17,18).

Im Gehirngewebe von Ratten,die mit 70mg 3-AP/kg Ratte vorbehandelt worden waren,findet ebenfalls ein fast gleichförmiger Abbau von markierter Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C statt.Der gefundene Quotient $^{14}C_{(6)}O_2$ / $^{14}C_{(1)}O_2$ =1,13 ist den Kontrollwerten gleich (Tab.2).

Tab.2 Wirkung der 3-AP-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C

6 Std.nach Verabreichung von 70 mg 3-AP/kg Ratte

-Versuche an Gehirnschnitten

	$^{14}CO_2/O_2$ aus $\left[\frac{dpm}{\mu l}\right]$						$\frac{^{14}C_{(6)}O_2}{^{14}C_{(1)}O_2}$
	Glucose-6-^{14}C			Glucose-1-^{14}C			
		n	$s\bar{x}$		n	$s\bar{x}$	
Kontrollen	450	22	± 10,9	397	22	± 8,9	1,134
3-AP (70mg/kg Ratte)	435	17	± 9,8	385	14	± 17,4	1,129
2P	>0,30 <0,40			>0,50 <0,60			

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$= Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist,hat sich der O_2-Verbrauch/mg Trockengewicht und Stunde gegenüber den Kontrollwerten nicht verändert,so daß auch hier ein RQ von 1 angenommen werden kann.

Tab.3 Wirkung der 3-AP-Vergiftung auf den Sauerstoffverbrauch (µl) von Hirngewebe bezogen auf mg Trockengewicht und Stunde
- 6 Stunden nach Verabreichung von 70 mg 3-AP/kg Ratte
- Versuche an Hirnschnitten

Substrat	QO_2 µl O_2/mg Trockengewicht Std. Kontrollen	n	$s\bar{x}$	3-AP (70mg/kg)	n	$s\bar{x}$	2P
Glucose-1-^{14}C	13,1	14	± 0,363	12,8	7	± 0,718	>0,70 <0,80
Glucose-6-^{14}C	12,7	19	± 0,308	12,3	17	± 0,264	>0,20 <0,30

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

Durch Synkavit im Inkubationsmedium in einer Konzentration von 10 mg% wird die Eliminierung von $^{14}CO_2$ aus Glucose-1-^{14}C gegenüber derjenigen aus Glucose-6-^{14}C erheblich gesteigert (18,19). Dieser Effekt wird bei den in Tabelle 4 zusammengestellten Ergebnissen besonders deutlich,da wegen des durch Synkavit erhöhten Sauerstoffverbrauchs (vgl.Tab.1) (15) der Anteil des $^{14}C_{(6)}O_2$ / µl O_2 gegenüber den Werten ohne Synkavit (vgl.Tab.2) deutlich verringert ist.

Tab.4 Wirkung der 3-AP-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Eliminierung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C 6 Stunden nach Verabreichung von 70 mg 3-AP/kg Ratte -
mit Synkavitzusatz (10mg%) zum Inkubationsmedium
-Versuche an Gehirnschnitten

	$^{14}CO_2/O_2$ (dpm/µl) aus Glucose-6-^{14}C			Glucose-1-^{14}C			$\frac{^{14}C_{(6)}O_2}{^{14}C_{(1)}O_2}$
		n	$s\bar{x}$		n	$s\bar{x}$	
Kontrollen (unbehandelt)	346	7	± 13,0	801	7	± 13,2	0,431
3-AP (70mg/kg Ratte)	375	6	± 13,8	827	7	± 17,5	0,454
2P	>0,10 <0,20			>0,20 <0,30			

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$=Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

Die Erniedrigung des Quotienten $^{14}C_{(6)}O_2/\ ^{14}C_{(1)}O_2$ könnte für eine Stimulierung des HMP-Weges sprechen, weil angenommen werden kann, daß durch Synkavit als Elektronenacceptor der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des HMP-Weges, nämlich die Reoxydation von NADPH, beeinflußt und dadurch die direkte Glucoseoxydation gesteigert wird (14,15,16,17).

Da Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in Gegenwart von 3-APADP langsamer als mit dem natürlichen Pyridinnucleotid reagiert (10), wäre ein Abfall der $^{14}C_{(6)}O_2$-Ausbeute bei Inkubation von Gehirnschnitten 3-AP-vorbehandelter Tiere zu erwarten.

Aber auch hier zeigt sich keine Änderung der $^{14}C_{(1)}O_2$-Entwicklung aus Gehirngewebe von Ratten, denen eine Dosis von 70mg 3-AP/ kg injiziert worden war.

b. 120mg 3-AP/kg Ratte -mit Synkavitzusatz (10mg%) zum Inkubationsmedium

Um sicher zu sein, daß das Ausbleiben einer Wirkung auf die $^{14}C_{(1)}O_2$-Eliminierung nicht auf einer zu geringen 3-AP-Gabe beruht, wurde der mit Synkavit stimulierte Glucose-1-^{14}C-Umsatz auch gemessen, nachdem die Tiere eine intraperitoneale Injektion von 120mg 3-AP /kg erhalten hatten.

Hierbei ergibt sich ebenfalls keine Verringerung der $^{14}C_{(1)}O_2$-Produktion (Tab.5).

Tab.5 Wirkung der 3-AP-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Eliminierung aus Glucose-1-^{14}C - 6 Std. nach Verabreichung von 120mg 3-AP/kg Ratte - mit Synkavitzusatz (10mg%) zum Inkubationsmedium - Versuche an Gehirnschnitten

	$^{14}CO_2/O_2$ (dpm/µl) aus Glucose-1-^{14}C			2P
		n	$s\bar{x}$	
Kontrollen (unbehandelt)	865	20	± 17,5	>0,60 <0,70
3-AP (120mg/kg Ratte)	878	21	± 18,7	

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$= Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

2. Wirkung der 6-AN-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C 6 Stunden nach Verabreichung von

70mg 6-AN/kg Ratte

ohne und

mit Synkavitzusatz (10mg%) zum Inkubationsmedium

Da Hirngewebe 6-AN-vorbehandelter Ratten dieselbe Sauerstoffmenge pro mg Trockengewicht veratmet wie Hirngewebe unbehandelter Kontrolltiere (Tab.6) und die $^{14}CO_2$-Entstehung aus dem nicht stimulierten Glucose-1-^{14}C-Abbau und dem durch Synkavit nicht stimulierbaren Glucose-6-^{14}C-Umsatz (15, vgl.Tab.4) bei Versuchen an 70mg 6-AN/kg-vorbehandelten Tieren gegenüber den Kontrollen unverändert bleibt (Tab.7), kann angenommen werden, daß auch unter 6-AN-Einfluß nur Glucose verbrannt wird (RQ=1).

Tab.6 Wirkung der 6-AN-Vergiftung auf den Sauerstoffverbrauch (µl) von Hirngewebe bezogen auf mg Trockengewicht und Stunde
- 6 Stunden nach Verabreichung von 70mg 6-AN/kg Ratte
- Versuche an Gehirnschnitten

Substrat	QO_2 (µl O_2/mg Trockengewicht Std.) Kontrollen			6-AN (70mg/kg Ratte)		
		n	$s\bar{x}$		n	$s\bar{x}$
Glucose-1-^{14}C	13,1	14	± 0,363	13,1	11	± 0,287

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

Tab.7 Wirkung der 6-AN-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C 6 Std.nach Verabreichung von

70 mg 6-AN/kg Ratte

ohne und

mit Synkavitzusatz* (10 mg%) zum Inkubationsmedium

- Versuche an Gehirnschnitten

Behandlung der Tiere	+	$^{14}CO_2/O_2$ (dpm/µl) Glucose-6-^{14}C n	s$\bar{x}$	Glucose-1-^{14}C n	s$\bar{x}$	$\frac{^{14}C_{(6)}O_2}{^{14}C_{(1)}O_2}$
Kontrollen (unbehandelt)	+	319 14	± 10,9	717 12	± 15,5	0,445
6-AN (70mg/kg R.)	+	349 13	± 9,6	553 21	± 10,0	0,631
2P		>0,05 <0,10		<0,001		——
Kontrollen (unbehandelt)	-	— —	——	388 14	± 8,4	——
6-AN (70mg/kg R.)	-	— —	——	410 14	± 14,1	——
2P		——		>0,10 <0,20		——

n = Zahl der Versuchsansätze

s$\bar{x}$=Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

Die durch Synkavit (10mg%) erhöhte $^{14}CO_2$-Ausbeute aus Glucose-

1-^{14}C (717 dpm $^{14}CO_2$/ml O_2) wird bei 6-AN-vorbehandelten Versuchstieren verringert (553 dpm $^{14}CO_2$/ml O_2),der stimulierende Effekt von Synkavit aber nicht völlig aufgehoben (Tab.7).
Beruht die Steigerung des Glucose-1-^{14}C-Umsatzes unter Synkaviteinfluß auf einer Erhöhung des NADP-abhängigen HMP-Weges (15,18, 19),so könnte die Depression der $^{14}C_{(1)}O_2$-Eliminierung nach Gabe von 6-AN auf eine Hemmung dieses Reaktionsweges zurückgeführt werden (10).

II.Versuche mit markierter Glucose mit Zellplasmaextrakt

(Phosphatpuffer-Zellplasma bzw. Trispuffer-Zellplasma)

Es war zu beobachten,daß im Zellplasma,das an verschiedenen Tagen hergestellt wurde,eine unterschiedliche $^{14}CO_2$-Eliminierung aus markierter Glucose stattfand.
Ebenso war innerhalb einer Versuchsreihe ein ständiger,offenbar zeitabhängiger Abfall des Glucoseabbaus zu CO_2 zu verzeichnen.
Da aber der Einfluß der Cofaktoren proportional konstant blieb, wurden die Ergebnisse ausgewertet und einige wichtige in Tabellen zusammengestellt.

a.Versuche mit Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C

1.und 2 Wirkung der 3-AP- bzw. 6-AN-Vergiftung auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C und -6-^{14}C

6 Stunden nach Verabreichung von

70 mg 3-AP/kg Ratte bzw.

70 mg 6-AN/kg Ratte

Bei der Inkubation von Zellplasma sowohl mit Glucose-1-^{14}C als auch mit Glucose-6-^{14}C ist kein Umsatz zu $^{14}CO_2$ meßbar,unabhän-

gig vom Aufbereitungs- und Inkubationsmedium (s.Methodik) (vgl. Tab.8).

Dasselbe gilt für Versuche an Tieren,die mit 70 mg 3-AP/kg Ratte bzw. 70 mg 6-AN/kg Ratte vorbehandelt worden waren.

3.Wirkung von NADP-Zusatz ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C

Durch Zugabe von 0,1 ml 10^{-2}m bzw. 10^{-3}m NADP zum Inkubationsmedium (≙ einer Endkonzentration von $5x10^{-4}$m bzw. $5x10^{-5}$m) läßt sich die $^{14}CO_2$-Ausbeute aus Glucose-1-^{14}C erheblich steigern, (Tab.8),während der Glucose-6-^{14}C-Stoffwechsel unbeeinflußt bleibt.

Da zellfreie Extrakte von Rattenhirn nur die Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges und des HMP-Weges enthalten (21),ist es sehr wahrscheinlich,daß durch NADP der HMP-Weg stimuliert und das $C_{(1)}O_2$ über diesen Weg freigesetzt wird (20,21).

b.Versuche mit Glucose-1-^{14}C mit Zellplasmaextrakt

1. Wirkung von

a. Vit.K_1 ($1,96x10^{-4}$m, $2,06x10^{-3}$m) -

b. Vit.K_3 (Menadion) ($5x10^{-7}$m,$5x10^{-6}$m,$5x10^{-4}$m) -

c. NADPH ($5x10^{-5}$m) -

d. NADPH ($5x10^{-5}$m) und Synkavit ($1,5x10^{-4}$m) -

Zusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C

Es erhob sich die Frage,ob das Ausbleiben eines Glucose-1-^{14}C Umsatzes ohne Zusatz von NADP durch Mangel an NADP (evl.bedingt durch Hydrolyse bei der Aufbereitung) oder NADPH-oxydierbaren

Substanzen hervorgerufen wird.

Zur Klärung wurden folgende Versuche durchgeführt :

α und β Zusatz von Elektronenacceptoren zum Inkubationsmedium (12,14,15,16)

Wie schon einmal ausgeführt wurde,kann das Pyridinferment nur katalytisch wirken,wenn das hydrierte Pyridinnucleotid NADPH + H^+ immer wieder reoxydiert wird.

Als Oxydationsmittel wurden in verschiedenen Versuchsreihen Vit.K_1 und Vit.K_3 (Menadion) (37) verwendet.

Die Versuche wurden in Phosphatpuffer-Zellplasma durchgeführt.

α. Inkubation des Plasmas mit Vit.K_1 in einer Endkonzentration von $1{,}96 \times 10^{-4}$m und $2{,}06 \times 10^{-3}$m führt nicht zu einer Steigerung des Glucose-1-^{14}C-Stoffwechsels.

β. Zugabe von Vit.K_3 (Menadion) in steigenden Endkonzentrationen (5×10^{-7}m, 5×10^{-6}m, 5×10^{-4}m) ergibt nur eine minimale Erhöhung der $^{14}CO_2$-Produktion aus Glucose-1-^{14}C.

γ. NADPH-Zusatz zum Inkubationsmedium

(Versuche mit Trispuffer-Zellplasma)

NADPH in einer Endkonzentration von 5×10^{-5}m regt den Glucose-1-^{14}C-Abbau zu $^{14}C_{(1)}O_2$ beträchtlich an,wenn auch nicht in dem Maße wie NADP in der gleichen Konzentration (Tab.8).

Fermente,die im Plasma die Oxydation von reduzierten Pyridinnucleotiden in Gegenwart geeigneter Acceptoren vermitteln,sind von Guidetta und Strecker (23,46) aus Säugerhirn isoliert worden.

Wir können annehmen,daß derartige Enzyme,die als Diaphorasen bezeichnet werden,im Inkubationsmedium die Oxydation von NADPH durch Luftsauerstoff bewirken.Auch Glu-

tathion-Reduktase kann als Oxydationsenzym wirken.

Die $^{14}CO2$-Eliminierung aus Glucose-1-^{14}C in Gegenwart von NADPH muß demnach auf das im Plasma entstandene oxydierte Pyridinnucleotid NADP zurückgeführt werden.

ʃ. NADPH- und Synkavit-Zusatz zum Inkubationsmedium

Die durch NADPH ($5x10^{-5}$m) bewirkte Stimulierung des Glucose-1-^{14}C-Umsatzes wird unter Synkaviteinfluß ($1,5x10^{-4}$ m) gehemmt (Tab.8).

Die Vermutung liegt nahe, daß das 2-Methyl-1,4-Naphthohydrochinon-Diphosphat nach Abspaltung der Phosphatgruppen durch die hydrolytische Wirkung der Phosphatasen einen Teil des im Plasma oxydierten Pyridinnucleotids reduziert, wodurch eine geringere Ausbeute an $^{14}C_{(1)}O_2$ gegenüber den Werten der Versuchsgruppe erklärlich ist.

(Versuche in Trispuffer-Zellplasma)

Tab.8 Wirkung von NADP-, NADPH- sowie von NADPH- und Synkavit-Zusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C - Versuche mit Trispuffer-Zellplasma

Zusatz zum Inkubationsmedium			dpm $^{14}CO_2$			2P
N A D P	N A D P H	Synkavit	1,0µC Glucose-1-^{14}C	n	$s\bar{x}(\pm)$	
—	—	—	—	3	—	——
$5x10^{-5}$m	—	—	36776	3	827	
—	$5x10^{-5}$m	—	18501	4	256	< 0,001
—	$5x10^{-5}$m	$5x10^{-5}$m	13355	3	291	< 0,001

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

Die Zusätze zum Inkubationsmedium wurden direkt in den Hauptraum des Warburggefäßes gegeben.Der Seitenarm enthielt 0,1 ml Glucose-1-^{14}C (1,0 µC/0,1 ml) und 0,1 ml 1%-ige unmarkierte Glucose.

Aus den Ergebnissen aller unter b.1. aufgeführten Versuche kann gefolgert werden,daß nach Aufarbeitung der Gehirne aus Mangel sowohl an oxydiertem als auch an reduziertem Pyridinnucleotid kein Umsatz von Glucose-1-^{14}C zu $^{14}CO_2$ stattfindet.
Um einen meßbaren Glucose-$C_{(1)}$-Stoffwechsel zu erreichen,muß dem Inkubationsmedium NADP oder NADPH zugesetzt werden.

2.Wirkung von 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C

α.6 Stunden nach Verabreichung von 70 mg 3-AP/kg Ratte
mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium
(Versuche mit Phosphatpuffer-Zellplasma)

Im Plasma von Tieren,die mit 70 mg 3-AP/kg vorbehandelt worden waren,bleibt der durch NADP (Endkonzentration $5x10^{-5}$m) stimulierte Glucose-1-^{14}C-Stoffwechsel unbeeinflußt.

β.ohne Vorbehandlung der Ratten
mit Zusatz von 3-APADP ($5x10^{-5}$m) und NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium
(Versuche mit Trispuffer-Zellplasma)

Bei Kombinationsversuchen mit dem natürlichen und dem unphysiologischen Nucleotid im Verhältnis 1:1 beträgt der Umsatz von Glucose-1-^{14}C zu $^{14}C_{(1)}O_2$ nur 19-42% des Versuchswertes,bei dem nur NADP ($5x10^{-5}$m) im Inkubationsmedium vorhanden war (Tab.9)

Tab.9 Wirkung von 3-APADP ($5x10^{-5}$m) - und NADP ($5x10^{-5}$m) - Zusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C

(Versuche mit Trispuffer-Zellplasma)

Zusatz zum Inkubationsmedium		dpm $^{14}CO_2$ 1,0mC Glucose-1-^{14}C			*	2P
N A D P	3-APADP		n	$s\bar{x}$	%	
$5x10^{-5}$m	———	180467	6	± 7877	41,90	< 0,001
$5x10^{-5}$m	$5x10^{-5}$m	75623	7	± 2151		
$5x10^{-5}$m	———	43467	6	± 1436	19,10	< 0,001
$5x10^{-5}$m	$5x10^{-5}$m	8304	7	± 362		

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

* = Umsatz in Gegenwart von 3-APADP bezogen auf Kontrollwerte ohne 3-APADP in %

Die Zusätze zum Inkubationsmedium wurden aus dem Seitenarm des Warburggefäßes zum Zeitpunkt 0 der Inkubation zugegeben (0,1 ml NADP 10^{-3}m , 0,1 ml 3-APADP 10^{-3}m)

3. Wirkung von 6-AN auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C

(Versuche mit Trispuffer-Zellplasma)

α. 6 Stunden nach Verabreichung von 70 mg 6-AN/kg Ratte mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$ m) zum Inkubationsmedium

Die durch NADP (Endkonzentration $5x10^{-5}$ m) erhöhte $^{14}C_{(1)}O_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C wird unter Einfluß der 6-AN-Vergiftung fast vollständig gehemmt (Tab.10).

Tab.10 Wirkung von 6-AN auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C 6 Stunden nach Verabreichung von 70 mg 6-AN/kg Ratte mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$ m) zum Inkubationsmedium
Versuche mit Trispuffer-Zellplasma

N A D P	dpm $^{14}CO_2$/ 1,0 µC Glucose-1-^{14}C Kontrollen			6-AN (70 mg/kg Ratte)			* %	2P
		n	$s\bar{x}$		n	$s\bar{x}$		
1) $5x10^{-5}$ m	4154	5	± 243	46	4	± 3,28	1,11	<0,001
$5x10^{-5}$ m	22560	6	± 1068	308	7	± 5,50	1,38	<0,001

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

* = Umsatz unter 6-AN-Vergiftung bezogen auf Kontrollwerte (unbehandelte Tiere) in %

1) = Zusatz von 0,1ml 1%-iger inaktiver Glucose aus dem Seitenarm des Warburggefäßes zum Zeitpunkt 0 der Inkubation

Zusatz von NADP erfolgte direkt in den Hauptraum des Warburggefäße

β. ohne Vorbehandlung der Ratten

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) und 6-ANADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

Gibt man das unphysiologische Pyridinnucleotid 6-ANADP und das natürliche Nucleotid NADP in einem Verhältnis von 1:1 zum Plasmaextrakt unbehandelter Ratten, beträgt der Glucose-1-^{14}C-Stoffwechsel zu $^{14}CO_2$ ca. 76% des Versuchswertes, bei dem nur NADP ($5x10^{-5}$m) im Inkubationsmedium vorhanden war (Tab.11).

Tab.11 Wirkung von 6-ANADP ($5x10^{-5}$m)-und NADP ($5x10^{-5}$m)-Zusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus Glucose-1-^{14}C

Versuche mit Trispuffer-Zellplasma

Zusatz zum Inkubationsmedium		$\frac{d\text{pm } ^{14}CO_2}{1{,}0\text{nC Glucose-1-}^{14}C}$			*	
N A D P	6-ANADP		n	$s\bar{x}$	%	2P
$5x10^{-5}$m	———	5592	6	± 103	73,4	<0,001
$5x10^{-5}$m	$5x10^{-5}$m	4105	5	± 72		
$5x10^{-5}$m	———	3886	6	± 54	78,9	<0,001
$5x10^{-5}$m	$5x10^{-5}$m	3065	6	± 46		

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

* = Umsatz in Gegenwart von 6-ANADP bezogen auf Kontrollwerte ohne 6-ANADP in %

Der Seitenarm enthielt 0,1 ml Glucose-1-^{14}C und

0,1 ml 5,4 %-ige inaktive Glucose

B. Die decarboxylierende Malatumsetzung zum Pyruvat durch das "malic enzyme" (Ochoa)

Versuche mit L-Malat-U-^{14}C mit Trispuffer-Zellplasma

1.Wirkung von

a.NADP ($5x10^{-5}$m)

b.NADPH ($5x10^{-5}$m)

c.NADPH ($5x10^{-5}$m) und Menadion (ca.10^{-4}m)

d.Menadion ($5x10^{-4}$m)

auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C (Tab.12)

a.Durch Zugabe von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium läßt sich eine enorme Steigerung der $^{14}CO_2$-Ausbeute aus L-Malat-U-^{14}C erreichen,ein Zeichen dafür,daß diese Umsetzung NADP-abhängig ist.

b.Auch NADPH ($5x10^{-5}$m) führt zu einer Erhöhung der $^{14}CO_2$-Eliminierung ,die auf eine Vermehrung von NADP im Zellplasma bei Zusatz des reduzierten Pyridinnucleotids zurückgeführt werden muß (vgl.Versuch A II b 1$_\gamma$).

c.Die unter NADPH ($5x10^{-5}$m)-Einfluß aus L-Malat-U-^{14}C freigesetzte CO_2-Menge wird in Gegenwart des Elektronenacceptors Menadion (ca.10^{-4}m) verdoppelt.
Menadion bewirkt die Reoxydation des reduzierten Pyridinnucleotids,wodurch der NADP-abhängige Malatumsatz zu Pyruvat und CO_2 unter Vermittlung des "malic-enzyme" angeregt wird.

d.Menadion ($5x10^{-4}$m) ohne Zusatz des Pyridinnuclectids hat nur einen geringen Einfluß auf die $^{14}CO_2$-Eliminierung aus L-Malat-U-^{14}C,der auf NADP-Mangel nach Aufarbeitung der Gehirne zu-

rückgeführt werden muß (vgl. Versuche A II b 1).

Tab.12 Wirkung von NADP,NADPH sowie von NADPH und Menadion, Menadion auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C -Versuche mit Trispuffer-Zellplasmaextrakt

	Zusatz zum Inkubationsmedium			dpm $^{14}CO_2$ / 0,4µC Malat-U-^{14}C	n	$s\bar{x}$	2P
	NADP	NADPH	Menadion				
a	-	-	-	4619	4	± 54	<0,001
	-	-	$5x10^{-4}$m	4842	5	± 106	
b	-	-	-	853	2	± 31	
	$5x10^{-5}$m	-	-	37630	3	± 119	<0,001
	-	$5x10^{-5}$m		25450	4	± 155	<0,001
	-	$5X10^{-5}$m	ca.10^{-4}m	58213	4	± 3481	<0,001

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$= Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

NADP-und NADPH-Zusatz direkt in den Hauptraum des Warburggefäßes

a. Menadion wurde aus dem Seitenarm des Warburggefäßes zum Zeitpunkt 0 der Inkubation zugesetzt

b. Menadionzugabe direkt in den Hauptraum des Warburggefäßes

2.Wirkung von 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C

a. 6 Std. nach Verabreichung von 70 mg 3-AP/kg Ratte

ohne und

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

Vorbehandlung der Ratten mit 70 mg 3-AP/kg beeinflußt den Malatumsatz zu CO_2 nicht (Tab.13).

Ebenso wird die durch NADP ($5x10^{-5}$m) stimulierte $^{14}CO_2$-Ausbeute aus L-Malat-U-^{14}C nach 3-AP-Vergiftung der Ratten nicht verändert (Tab.13).

Tab.13 Wirkung von 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C 6 Std. nach Verabreichung von 70 mg 3-AP/kg Ratte

ohne und

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

N A D P	dpm $^{14}CO_2$ / 0,4 µC ^{14}C-Malat						2P
	Kontrollen (unbehandelt)	n	$s\bar{x}$	3-AP (70mg/kg Ratte)	n	$s\bar{x}$	
———	4239	1		4065	4	± 71	<0,40 >0,30
———	4197	4	± 94	4614	2	± 42	>0,025 <0,05
$5x10^{-5}$m	48300	2	±578	47540	3	±984	>0,10 <0,20
$5x10^{-5}$m	49820	4	±769	51370	3	±499	>0,60 <0,70

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

b. ohne Vorbehandlung der Ratten
mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) und 3-APADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

Unter Zusatz des unphysiologischen Pyridinnucleotids 3-APADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium wird der mit NADP ($5x10^{-5}$m) erhöhte Malatstoffwechsel geringfügig erniedrigt (ca. 4-15%) (Tab.14).

Tab.14 Wirkung von NADP ($5x10^{-5}$m)- und 3-APADP ($5x10^{-5}$m)-Zusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus L-Malat-U-^{14}C
Versuche mit Trispuffer-Zellplasma

dpm $^{14}CO_2$ / 0,4 µC L-Malat-U-^{14}C Zusatz zum Inkubationsmedium						* %	2P
NADP ($5x10^{-5}$m)	n	$s\bar{x}$	NADP + 3-APADP ($5x10^{-5}$m)($5x10^{-5}$m)	n	$s\bar{x}$		
28760	6	± 287	27640	7	± 389	96,1	>0,025 <0,050
74740	4	± 473	63780	4	± 364	85,3	<0,001
48060	4	± 863	45080	4	± 224	93,8	>0,010 <0,020
44050	4	± 284	42650	4	± 258	96,8	>0,010 <0,020

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

* = Umsatz in Gegenwart von 3-APADP bezogen auf Kontrollwerte ohne 3-APADP-Zusatz in %

Alle Zusätze wurden zum Zeitpunkt 0 der Inkubation aus dem Seitenarm des Warburggefäßes zugegeben, nur bei 1 direkt in den Hauptraum

3.Wirkung von 6-AN auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C

a. 6 Std. nach Verabreichung von 70 mg 6-AN/kg Ratte

ohne und

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

Bei Versuchen an Tieren,die mit 70 mg 6-AN/kg behandelt worden waren,beträgt sowohl der nicht stimulierte als auch der durch NADP ($5x10^{-5}$m) stimulierte Malatumsatz im Vergleich zu Versuchen an unbehandelten Kontrolltieren nur 64,2-73,7 % bzw. 64,7-67,2 % (Tab.15).

Tab.15 Wirkung von 6-AN auf die $^{14}CO_2$- Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C 6 Std. nach Verabreichung von 70 mg 6-AN/kg Ratte

ohne und

mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

N A D P	dpm $^{14}CO_2$/ 0,4 µC L-Malat-U-^{14}C Kontrollen	n	$s\bar{x}$	6-AN (70mg/kg Ratte)	n	$s\bar{x}$	* %	2P
-	5750	3	± 9	4236	4	± 50,6	73,7	<0,001
-	4886	2	± 47	3137	2	± 53,5	64,2	>0,001 <0,005
$5x10^{-5}$m	56750	2	± 1124	38129	4	± 1536,0	67,2	>0,001 <0,005
$5x10^{-5}$m	47540	4	± 770	30770	5	± 163,0	64,7	<0,001

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$= Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

* = Umsatz unter 6-AN-Vergiftung bezogen auf Kontrollen (unbehandelt) in %

Der Zusatz von NADP erfolgte direkt in den Hauptraum des Warburggefäß

b. ohne Vorbehandlung der Ratten
mit Zusatz von NADP ($5x10^{-5}$m) und 6-ANADP ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium

Inkubation des Zellplasmaextraktes in Gegenwart des unphysiologischen Pyridinnucleotids 6-ANADP ($5x10^{-5}$m) und des normalen Pyridinnucleotids NADP ($5x10^{-5}$m) im Verhältnis 1:1 führt zu einer Erniedrigung der mit NADP ($5x10^{-5}$m) stimulierten $^{14}CO_2$-Ausbeute (Tab.16).

Tab.16 Wirkung von NADP ($5x10^{-5}$m) und 6-ANADP ($5x10^{-5}$m) auf die $^{14}CO_2$-Eliminierung aus L-Malat-U-^{14}C

dpm $^{14}CO_2$ / 0,4 µC L-Malat-U-^{14}C Zusatz zum Inkubationsmedium						* %	2P
NADP ($5x10^{-5}$m)	n	$s\bar{x}$	NADP ($5x10^{-5}$m) + 6-ANADP ($5x10^{-5}$m)	n	$s\bar{x}$		
54550	5	± 424	38400	4	± 434	70,4	<0,001
74740	4	± 473	50920	5	± 630	68,1	<0,001
48060	4	± 863	42480	3	± 1038	88,4	>0,001 <0,005
44050	4	± 284	32500	5	± 347	73,8	<0,001

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

Alle Zusätze wurden aus dem Seitenarm zum Zeitpunkt 0 der Inkubation zugegeben, außer bei 1 direkt in den Hauptraum

* = Umsatz in Gegenwart von 6-ANADP bezogen auf Kontrollen ohne 6-ANADP in %

4.Wirkung von NAD ($5x10^{-5}$m)-Zusatz zum Inkubationsmedium auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C

Zusatz von NAD ($5x10^{-5}$m) zum Inkubationsmedium führt zu einem Abfall der $^{14}CO_2$-Ausbeute um 27 % (Tab.17),der wahrscheinlich dadurch zustande kommt,daß die Dehydrogenase-Reaktion einen Teil des angebotenen markierten Malats der Decarboxylierungs-Reaktion des "malic-enzymes" entzieht.

Tab.17 Wirkung von NAD ($5x10^{-5}$m) auf die $^{14}CO_2$-Entstehung aus L-Malat-U-^{14}C

Zusatz N A D	dpm $^{14}CO_2$/ 0,4 µC L-Malat-U-^{14}C	n	$\pm s\bar{x}$	* %	2P
-	5014	6	± 68,6	73	<0,001
$5x10^{-5}$m	3661	5	± 68,6		

n = Zahl der Versuchsansätze

$s\bar{x}$= Standardabweichung des Mittelwertes $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

* = Einfluß von NAD in %

Der Zusatz von NAD erfolgte direkt in den Hauptraum des Warburggefäßes.

Diskussion

Die CO_2-Elimination aus Glucose kann sowohl über die Glycolyse und den Tricarbonsäurecyclus als auch über den HMP-Weg erfolgen. Unter der Voraussetzung, daß die Triosephosphate (Dihydroxyaceton-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat) im Gleichgewicht stehen, ist der Abbau der C-Atome 1 und 6 beim Glucoseumsatz über die Glycolyse und den Tricarbonsäurecyclus identisch, da beide als Methylgruppen des Pyruvats erscheinen.

Beim Glucoseabbau über den Pentosephosphatcyclus geht dagegen $C_{(1)}$ primär als CO_2 verloren, während $C_{(6)}$ den Cyclus durchläuft und zum Aufbau von Hexose wieder verwendet wird.

Als Index für die Feststellung einer Beteiligung des HMP-Weges am Glucosestoffwechsel bei Inkubation von Hirnschnitten bzw. Zellplasma mit entsprechend markierter Glucose kann der Quotient CO_2-Bildung aus Glucose-6-^{14}C / CO_2-Bildung aus Glucose-1-^{14}C dienen.

Der in den Versuchen an Gehirnschnitten gefundene Quotient 1,13 zeigt, daß die C-Atome 1 und 6 nahezu gleichwertig abgebaut werden und eine Beteiligung des HMP-Weges am Glucosestoffwechsel unter den gewählten Versuchsbedingungen in einem nicht meßbaren Umsatz stattfindet.

Da sowohl die Enzyme als auch die Stoffwechselprodukte des HMP-Weges im Rattenhirn nachgewiesen worden sind (21,24,26), muß man auf einen funktionierenden HMP-Weg schließen.

Es zeigte sich, daß die $C_{(1)}$-Eliminierung von Gehirnschnitten durch künstliche Elektronenacceptoren wie Synkavit erheblich gesteigert wurde, so daß der Quotient 14 $C_{(6)}O_2$/ $^{14}C_{(1)}O_2$ sich ver-

kleinerte.

Es kann also angenommen werden,daß das Ausmaß des Glucoseumsatzes über den HMP-Weg von der Geschwindigkeit der NADPH-Reoxydation bestimmt wird (7,12,18,24,34).

Während die Enzyme des Tricarbonsäurecyclus in den Mitochondrien lokalisiert sind,befinden sich die Enzyme der Glycolyse und des HMP-Weges in der löslichen Zellfraktion (21).

Im Zellplasma ist über den Glycolyseweg keine Eliminierung der C-Atome 1 und 6 zu erwarten,da diese C-Atome der Glucose nur über den Tricarbonsäurecyclus in CO_2 umgewandelt werden können. Da im Zellplasma kein Umsatz der Glucose-1-^{14}C über den HMP-Weg meßbar ist,und der Versuch,diesen Umsatz durch Menadion (Vit. K_3) (12,15,16) und Vit.K_1 zu stimulieren,keinen Erfolg zeigt, muß angenommen werden,daß ein Mangel an NADP im Inkubationsmedium vorliegt.Dieser könnte dadurch bedingt sein,daß NADP bei der Plasmaaufbereitung zum Teil hydrolysiert wird,oder auch dadurch,daß beim Homogenisieren des Gewebes in einer Lösung die Coformente,die ja frei diffusibel sind,zu stark verdünnt werden. Sowohl durch NADP (20,21) als auch durch NADPH wurde die CO_2-Produktion aus Glucose-1-^{14}C erheblich gesteigert,d.h.,durch die Cofaktoren läßt sich der Pentosephosphatcyclus aktivieren. Die $^{14}CO_2$-Eliminierung aus Glucose-1-^{14}C in Gegenwart von NADPH läßt sich nur so erklären,daß im Zellplasma Fermente vorhanden sind,die die Oxydation des reduzierten Pyridinnucleotids bewirken(23,40).

Es zeigte sich,daß Synkavit im Zellplasmaextrakt den stimulierenden Effekt von NADPH auf die $C_{(1)}O_2$-Eliminierung aus Glucose-1-^{14}C erniedrigt,während es an Hirnschnitten die Reoxydation von NADPH durchführt.

Die oxydierende Wirkung des Synkavits in der Zelle beruht nach Dument (19) darauf,daß es zunächst über die Atmungskette,die in den Mitochondrien lokalisiert ist,oxydiert und dadurch zur Aufnahme des Wasserstoffs vom NADPH befähigt wird.Im Zellplasma dagegen gibt das nach Abspaltung der Phosphatgruppen entstehende Hydrochinon offenbar Wasserstoff an das reoxydierte Coferment ab, so daß der stimulierende Effekt des NADP durch Synkavit beeinträchtigt wird.

In Gegenwart des Elektronenacceptors Menadion wird die Freisetzung von $^{14}CO_2$ aus uniform markierten Malat im Zellplasma nur in ganz geringem Maße gesteigert.Dagegen läßt sich die Decarboxylierung des Malats sowohl durch NADP als auch durch NADPH und insbesondere durch Kombination von NADPH mit Menadion anregen.Da der stimulierende Effekt des Menadion ohne Zusatz der Cofaktoren nur gering ist,muß angenommen werden, daß auch hier die niedrige NADP-Konzentration der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist.(vgl.9).

Würde die beobachtete Erhöhung der $^{14}CO_2$-Eliminierung in Gegenwart von NADP aus der NAD-abhängigen Malatdehydrogenase-Reaktion mit anschließender Spontandecarboxylierung des so entstandenen Oxalacetats resultieren,dann sollte mit NAD anstelle von NADP ein höherer Umsatz zu messen sein,denn mit NADP als Cofaktor verläuft die Malatdehydrogenase-Reaktion wesentlich langsamer.

Da bei Versuchen mit NAD die CO_2-Ausbeute aus Malat aber verringert wird,müßte der erhöhte Malatstoffwechsel in Gegenwart von NADP tatsächlich auf einer Beschleunigung der L-Malat-NADP-Oxydoreduktase-Reaktion (decarboxylierend) (E.C.1.1.1.40) beruhen.

Wie aus den Versuchen hervorgeht,ist für die Reaktionsgeschwindigkeit des HMP-Weges und der Malatenzym-Reaktion die Konzentration des Coenzyms der limitierende Faktor.

Bei Ausfall eines bestimmten Anteils des NADP,bedingt durch Umwandlung in das 3-AP- oder 6-AN-Derivat,wird der Umsatz von Reduktionsäquivalenten vermindert (10,11).

Außerdem werden die NADP-abhängigen Fermente durch die Coenzym-Analogen in verschiedenem Ausmaß gehemmt (10,11).

Wird die Hälfte des natürlichen Nucleotids NADP durch 3-APADP ersetzt,bleibt der Malatstoffwechsel nahezu unbeeinflußt,(eine Beschleunigung der Reaktion,die Coper und Neubert feststellen konnten (11),ließ sich allerdings nicht nachweisen) während der Glucose-Stoffwechsel über den HMP-Weg stark beeinträchtigt wird.

Im Gehirnextrakten 3-AP-vergifteter Ratten tritt unter den gewählten Versuchsbedingungen keine meßbare Veränderung des Glucose- und Malatstoffwechsels zu CO_2 auf.

Die Ursache hierfür könnte darin liegen,daß der Einbau von 3-AP in die Adenosin-Phosphat-Ribose nicht hoch genug ist,er beträgt 27-31%.Auch bei in vitro-Versuchen mit NADP und 3-APADP wurde eine deutliche Hemmung der Reaktion erst festgestellt, wenn mehr als 40% des Antivitamins in das Nucleotid eingebaut worden waren (10).

Als weiterer Grund für das Ausbleiben einer Wirkung der 3-AP-Vergiftung auf die beiden Stoffwechselwege kann angeführt werden, daß 3-APADP im Rattenhirnhomogenat schneller als NADP hydrolysiert wird(25).

Enthält der Reaktionsansatz NADP und 6-ANADP zu gleichen Teilen ($5x10^{-5}$m),werden sowohl der HMP-Weg als auch der Malatumsatz im

Zellplasmaextrakt um ca. 30 % reduziert.
Im Gehirnextrakten 6-AN-verbehandelter Ratten konnte eine sehr starke Umsatzminderung beobachtet werden.
Da der Effekt trotz Zugabe einer relativ großen NADP-Menge zum Plasmaextrakt auftritt,kann man ihn nicht alleim auf die Wirkung des in vivo gebildeten 6-ANADP zurückführen.
Neuere Untersuchungen haben gezeigt (38,41),daß es im Gehirn 6-AN-vergifteter Ratten aufgrund kompetitiver Hemmung der NADP-abhängigen 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch 6-ANADP zu einer starken Anreicherung von 6-Phosphogluconat kommt.
Es ist daher anzunehmen,daß unter NADP-Zusatz zu Zellplasmaextrakt 6-AN-verbehandelter Ratten zunächst der aufgestaute unmarkierte 6-Phosphogluconat-Pool verstoffwechselt wird,der innerhalb der Versuchszeit nicht nennenswert aufmarkiert werden kann.
Die bedeutend geringere $^{14}C_{(1)}O_2$-Eliminierung aus Glucose-1-^{14}C nach 6-AN-Vergiftung im Vergleich zur $^{14}C_{(1)}O_2$-Produktion nach Zusatz von 6-ANADP zu Plasmaextrakten unbehandelter Tiere beruht demnach auf einer Verdünnung des zugeführten markierten Substrats durch die angereicherten unmarkierten Stoffwechselprodukte.

Vergleicht man die Wirkung der beiden Antivitamine 6-AN und 3-AP miteinander,so sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen:
Beide Substanzen werden in die Nucleotide des Gehirns eingebaut. Die Biosynthese von 6-ANADP ist aber offensichtlich ausgeprägter als die von 3-APADP.Zudem kann 3-APADP schneller hydrolysiert werden (25) als 6-ANADP.Die Wasserstoffübertragung mit 3-APADP als Coenzym findet verlangsamt statt,dagegen ist das nicht reduzierbare NADP-Analoge 6-ANADP zum Wasserstofftransport nicht fähig.

Es konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, daß:

1. der HMP-Weg durch 6-AN-Gabe am Tier bis einschließlich der Stufe der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase stark gehemmt werden kann, während der glycolytische Stoffwechsel offensichtlich nicht beeinflußt wird.

2. auf der Stufe des "malic-enzymes" im Zellplasmaextrakt 6-AN-verbehandelter Ratten eine Hemmung beobachtet werden kann.

3. in unserer Versuchsanordnung 3-AP-Gabe am Tier keinen Effekt auf den Malat- oder Glucose-Stoffwechsel zeigt.

4. der Sauerstoffverbrauch durch die Coenzymanalogen 3-APADP und 6-ANADP unbeeinflußt bleibt.

Zusammenfassung

A.I. Bei Inkubation von Gehirnschnitten mit Glucose-1-^{14}C bzw. Glucose-6-^{14}C werden gleiche Anteile von $^{14}CO_2$, bezogen auf die verbrauchte Sauerstoffmenge produziert. Der Quotient $^{14}C_{(6)}O_2 / {}^{14}C_{(1)}O_2 = 1{,}13$ ist bei 3-AP- bzw. 6-AN-vergifteten Ratten gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren nicht verändert.

In Gegenwart von Synkavit im Inkubationsmedium wurde der Sauerstoffverbrauch von Hirnschnitten gesteigert und die auf Sauerstoff bezogene $C_{(1)}O_2$- Eliminierung gegenüber der $C_{(6)}O_2$- Ausbeute erhöht. Es ergibt sich ein erniedrigter Quotient $^{14}C_{(6)}O_2 / {}^{14}C_{(1)}O_2$ von 0,43. Die 3-AP-Vergiftung hat keinen Einfluß auf den stimulierten Stoffwechsel, während 6-AN-Gabe am Tier den angeregten $C_{(1)}$-Umsatz stark verringert.

A.II. Bei Inkubation von Zellplasmaextrakt mit Glucose-1-^{14}C bzw. Glucose-6-^{14}C war kein Umsatz zu $^{14}CO_2$ meßbar. Auch durch Elektronenacceptoren (Vit.K_1, Menadion) ließ sich der Stoffwechsel nicht anregen, dagegen führten NADP (5×10^{-5}m) und NADPH (5×10^{-5}m) zu einer erhöhten $C_{(1)}O_2$-Ausbeute. Die stimulierende Wirkung wurde durch Synkavit zum Teil aufgehoben.

3-AP-Vergiftung bewirkt keine Änderung des durch NADP (5×10^{-5}m) erhöhten Glucose-1-^{14}C-Abbaus im Zellplasma. In Gegenwart von gleichen Mengen an natürlichem Nucleotid und 3-APADP (5×10^{-5}m) beträgt der $C_{(1)}$-Umsatz zu $^{14}C_{(1)}O_2$

nur noch 19-40 % des Versuchswertes,bei dem nur NADP ($5x10^{-5}$m) im Inkubationsmedium vorhanden war.
6-AN-Vergiftung führt zu einer fast vollständigen Hemmung der $^{14}CO_2$-Entstehung aus Glucose-1-^{14}C,dagegen beträgt diese bei Vorliegen eines Gemisches aus 50% NADP und 50 % 6-ANADP ($5x10^{-5}$m) noch 25 % des Kontrollwertes ohne 6-ANADP.

B. Die Malatenzym-Reaktion im Zellplasma kann durch Zugabe sowohl von NADP als auch von NADPH beschleunigt werden. Gibt man außer NADPH zusätzlich noch Menadion zum Inkubationsmedium,wird die durch das Coenzym erhöhte $^{14}CO_2$-beute gesteigert,während Menadionzusatz ohne gleichzeitiges Hinzufügen der Cofaktoren die Reaktion nicht beeinflußt.
3-AP-Vergiftung hat keinen Einfluß auf den Malatstoffwechsel.Dieser wird geringfügig erniedrigt,wenn die Hälfte des natürlichen Nucleotids durch das 3-AP-Analoge ersetzt ist.
Sowohl 6-AN-Gabe am Tier als auch Ersatz von 50% des Coenzyms durch 6-ANADP bewirken eine Hemmung des Malatumsatzes von 30 %.

Ich danke Herrn Professor Dr.med.Hans Herken für die Überlassung des Themas.

Besonderen Dank auch Herrn Dipl.Chem.Dr.Klaus Lange für seine Beratung und tatkräftige Unterstützung.

Verwendete Substanzen

x_1 Phosphatpuffer ph 7,4

(nach H.A.Krebs Biochim.Biophys.Acta Vol.4,249,1950)

NaCL	6,980	g/l
KCl	0,430	g/l
KH_2PO_4	0,197	g/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,357	g/l
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	2,390	g/l
$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	0,525	g/l
Glucose	2,140	g/l

x_2 Saccharoselösung 0,25 m

x_3 Trispuffer ph 7,4

(Methods of Enzymologie Bd.1,145)

x_4 Kieselgel-Dioxangemisch

Dioxangemisch:

PPO	4,0	g	mit Dioxan auf 1 l gelöst
POPOP	0,2	g	
Naphthalin	60,0	g	
Äthylenglycol	20,0	ml	
Methanol	100,0	ml	

in einem Zählgefäß sind enthalten:

1. Thixotropic Gel 0,350 g
   Powder (Cab-O-Sil) von Packard
2. Dioxangemisch 10 ml

Literaturhinweise

1. H.Herken V.Neuhoff	Hoppe Seylers Z.physiolog.Chemie	331, 85	(1963)
2. H.Coper H.Herken	Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak.	243, 291	(1962)
3. A.Brunnemann H.Coper H.Herken	Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak.	244, 223	(1962)
4. A.Brunnemann H.Coper	Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak.	246, 63	(1963)
5. H.Coper D.Neubert	J.Neurochem.	10, 513	(1963)
6. F.Willing V.Neuhoff H.Herken	Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak.	247, 254	(1964)
7. F.Rossi M.Zatti	Biochim.Biophys.Acta	113, 395	(1966)
8. S.Ochoa	Methods in Enzymologie	1, 739	
9. R.Y.Hsu H.A.Lardy W.W.Cleland	J.Biolog.Chemistry	242,5315	(1967)
10. H.Coper D.Neubert	Biochim.Biophys.Acta	89, 23	(1964)
11. D.Neubert H.Coper	Biochem.Zeitschrift	341, 485	(1965)
12. K.Nishimura Y.Kimura	Jap.J.Exp.Med.	Vol.35,5, 359	(1965)

13. H.W.Elliot, A.E.Warrens, H.P.James — J.Pharmacol.exp.Therap. — 91, 98 (1947)

14. K.Nishimura, Y.Kimura — Jap.J.Exp.Med. — Vol.35,5, 343 (1965)

15. F.C.G.Hoskin — Biochim.Biophys.Acta — 40, 309 (1960)

16. F.C.G.Hoskin — Biochim.Biophys.Acta — 62, 11 (1962)

17. F.C.G.Hoskin, C.D.Allerand — J.Neurochem. — 15, 427 (1968)

18. M.E.Krass, F.S.Labella — Biochim.Biophys.Acta — 148, 384 (1967)

19. J.E.Dumont — Biochim.Biophys.Acta — 50, 506 (1961)

20. S.S.Hotta — J.Neurochemistry — 9, 43 (1962)

21. R.M.Guerra, E.Melgar, M.Villaviencio — Biochim.Biophys.Acta — 148, 356 (1967)

22. A.Brunnemann, H.Coper — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. — 246, 493 (1964)

23. W.Levine, A.Guidetta, S.Englard, H.J.Strecker — J.Neurochemistry — 6, 28 (1960)

24. F.Novello, P.McLean — Biochem.J. — 107, 755 (1968)

25. A.Brunnemann, H.Coper, H.Herken — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. — 245, 541 (1963)

26. R.L.Friede, LaDona M.Fleming, M.Knoller — J.Neurochem. — 10, 236 (1963)

27. N.O.Kaplan, Ciotti, Stolzenbach — J.Biolog.Chemistry — 221, 833 (1956)

28. L.J.Zatmann, N.O.Kaplan — J.Biolog.Chemistry — 209, 453 (1954)

29. H.Herken, V.Neuhoff — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. — 247, 187 (1964)

30. A.Brunnemann, H.Coper, D.Neubert — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. — 246, 437 (1963/64)

31. H.Coper, H.Hadass, H.Lison — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. — 255, 97 (1966)

32. A.Brunnemann, H.Coper — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. — 250, 469 (1965)

33. A.Brunnemann, H.Coper — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. — 248, 514 (1964)

34. J.E.Dumont, J.Elroy — Bull.Soc.Chim.Biolog. — 48, 155 (1966)

35. G.E.Glock, P.McLean — Biochem.J. — 61, 388 (1955)

36. J.N.Santos, K.W.Hempstead, L.E.Kopp, R.P.Miech — J.Neurochemistry — 15, 367 (1968)

37. H.Nishibayashi, N.Nakai, R.Sato — J.Biochemistry Tokyo — 62, 215 (1967)

38. H.Herken, K.Lange — N.S.Arch.exp.P.P. — 263, 496 (1969)

39. K.B.Jakobson, N.O.Kaplan — J.Biolog.Chemistry 226, 603 (1957)

40. A.Guidetta, H.J.Strecker — Biochim.Biophys.Acta 48, 10 (1961)

41. H.Herken, K.Lange, H.Kolbe — Biochem.Biophys.Research Communications Vol.36,No.1 (1969)

Lebenslauf

Am 12.5.43 wurde ich,Barbara Engelbert,als Tochter des Arztes Maximilian Engelbert und der Ärztin Ingeborg Helene Engelbert in Jena geboren.Kindheit und Schulzeit verbrachte ich in Naumburg/Saale,heute DDR.Im Jahre 1959 kam meine Familie nach Berlin-West.Hier besuchte ich die Bertha-von-Suttner-Schule in Reinickendorf (OWZ) und legte im September 1963 das Abitur ab. Seit dem Wintersemester 1963/64 studierte ich an der "Medizinischen Fakultät" der FU-Berlin.Hier bestand ich am 21.10.1964 die "Naturwissenschaftliche Vorprüfung",am 13.9.1966 die"Ärztliche Vorprüfung" und am 20.2.1970 die"Ärztliche Prüfung". Während meiner Medizinalassistentenzeit arbeitete ich vier Monate in der Pathologie im Krankenhaus Neukölln,vier Monate auf der chirurgischen Abteilung im Krankenhaus Westend und im gleichen Krankenhaus vier Monate auf der Hämatologie.Hier bin ich zur Zeit noch als Medizinalassistentin tätig.